



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 36 664 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/79
C 12 N 5/10
C 07 K 14/005

②① Aktenzeichen: P 44 36 664.7
②② Anmeldetag: 13. 10. 94
④③ Offenlegungstag: 4. 7. 96

DE 44 36 664 A 1

⑦① Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 14195 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Müller-Boré & Partner, 81671 München

⑦② Erfinder:
Hellbronn, Regine, Dr., 82152 Planegg, DE

⑤④ Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft die Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen. Ferner betrifft die Erfindung ein zur Herstellung der Zellen verwendbares Expressionsplasmid.

DE 44 36 664 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen. Ferner betrifft die Erfindung ein zur Herstellung der Zellen verwendbares Expressionsplasmid.

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind einzelsträngige, zu den Parvoviren gehörende DNA-Viren. Zu ihrer Replikation benötigen AAVs Helferviren, insbesondere Adenoviren oder Herpesviren. In Abwesenheit von Helferviren integrieren AAVs in das Wirtszell-Genom, insbesondere an einer spezifischen Stelle von Chromosom 19 bzw. 17.

Auf dem 4,65-kb großen, linearen Genom von humanem AAV-Typ 2 wurden drei virale Funktionen lokalisiert. Die 145 bp langen "inverted repeats" dienen als Replikationsursprung und als cis Signale für Integration und Verpackung. Das cap Gen codiert für drei Strukturproteine und das rep Gen für eine Familie multifunktionaler Regulatorproteine. Die mRNAs für Rep 78 und seine C-terminal gespleißte Version Rep 68 starten am p5 Promotor. Zwei N-terminal verkürzte Versionen von Rep 78 und R 68, nämlich Rep 52 bzw. Rep 40, werden unter der Kontrolle des p19 Promotors exprimiert. Rep Proteine sind für die DNA-Replikation von AAV notwendig. Ferner werden sie für die Genregulation von AAV benötigt.

AAVs unterdrücken die Tumorentwicklung in Tieren. Ferner unterdrücken sie die durch Onkogene bedingte Zelltransformation wie auch die induzierte DNA-Amplifikation. Desweiteren haben AAVs eine antiproliferative Wirksamkeit.

Rep-Proteine von AAV werden für vorstehende Aktivitäten verantwortlich gemacht. Eine Lokalisierung dieser Aktivitäten auf den einzelnen Rep-Proteinen bzw. Domänen davon existiert jedoch nicht. Eine solche wäre aber notwendig, um AAVs therapeutisch einsetzen zu können. Eine Möglichkeit, diese Lokalisierung zu erreichen, liegt in der Untersuchung von AAVs, die Mutationen in den Rep-Proteinen aufweisen. Viele Versuche wurden diesbezüglich durchgeführt. Bisher ist es allerdings nicht gelungen, rep-negative AAV-Mutanten bereitzustellen, die frei von Wildtyp-AAV sind. Solche sind aber für vorstehende Untersuchungen unerlässlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem rep-negative AAV-Mutanten ohne vorstehende Nachteile erhalten werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der Erfindung sind somit Zellen, welche die AAV-Rep-Proteine 78 und 52 sowie 40 und/oder 68 stabil exprimieren. Bevorzugt werden Zellen, welche die Rep-Proteine 78, 52 und 40 exprimieren.

Erfindungsgemäße Zellen können in üblicher Weise hergestellt werden. Vorliegend werden Zellen der bekannten Linie HeM1 als Ausgangsmaterial verwendet (vgl. "5th Parvovirus Workshop", Crystal River, Florida, USA, Nov. 10-14, 1993). Diese Zellen exprimieren die AAV-Rep-Proteine 78 und 52, wobei die Rep 78-Expression unter der Kontrolle von Dexamethason-induzierbarem MMTV-LTR steht. Zellen von HeM1 werden mit einem für Rep 40 codierenden Expressionsplasmid und/oder einem für Rep 68 codierenden bzw. einem Expressionsplasmid transfiziert, das für beide Rep-Proteine codiert. Vorzugsweise wird ein Expressionsplasmid für Rep 40 verwendet, wobei das Expressionsplasmid pCMRep 40 ganz besonders bevorzugt ist. In die-

sem liegt die für Rep 40 codierende DNA zwischen den Schnittstellen NotI und XbaI des bekannten Vektors pKEX-2-XL vor (vgl. Rittner, K.H. et al, Methods Mol. Cell. Biol. 2 (1991), 176-181). pCMRep 40 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) unter DSM 9491 am 7. Okt. 1994 hinterlegt. Es stellt auch einen Gegenstand der Erfindung dar.

Die durch Transfektion von pCMRep 40 erhaltenen Zellen exprimieren stabil die AAV-Rep-Proteine 78, 52 und 40. Diese Zellen wurden als Zelllinie He 10-1, He 22-2 und He 5-5 bei der DSM unter DSM ACC2193, DSM ACC2192 bzw. DSM ACC21 91 am 28. Sept. 1994 hinterlegt. Sie stellen ebenso einen Gegenstand der Erfindung dar.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von repnegativen AAV-Mutanten. Ein solches Verfahren umfaßt die folgenden Verfahrensschritte:

- (a) Transfektion erfindungsgemäßer Zellen mit der DNA einer rep-negativen AAV-Mutante,
- (b) Behandlung der transfizierten Zellen von (a) mit einem eine AAV-Replikation ermöglichenden Mittel, insbesondere einem AAV-Helfervirus, und
- (c) Isolierung der in (b) erhaltenen rep-negativen AAV-Mutanten.

Der Verfahrensschritt (a) impliziert auch die Infektion erfindungsgemäßer Zellen mit einer rep-negativen AAV-Mutante. Desweiteren kennt der Fachmann sämtliche zur Durchführung vorstehender Verfahrensschritte notwendigen Techniken. Ergänzend wird auf Maniatis et al, Molecular Cloning: A laboratory manual (1982), Cold Spring Harbor, New York, verwiesen.

Der Ausdruck "DNA einer rep-negativen AAV-Mutante" umfaßt eine für Rep codierende DNA, die jegliche Art von Mutationen tragen kann. Insbesondere kann es sich um Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen von ein oder mehreren Nukleotiden handeln. Auch kann die AAV-DNA eine Deletion des gesamten für Rep codierenden Bereichs aufweisen. Desweiteren kann die Rep codierende DNA teilweise oder ganz durch eine für ein Fremdprotein codierende DNA ersetzt sein. Vorzugsweise ist das Fremdprotein ein für eine Gentherapie verwendbares Protein bzw. Peptid davon. Der Ausdruck "rep-negative AAV-Mutante" impliziert somit auch den Begriff "rep-negativer AAV-Vektor".

Desweiteren umfaßt der Ausdruck "DNA einer rep-negativen AAV-Mutante" auch eine DNA, die neben den vorstehend angegebenen Mutationen weitere Mutationen in anderen Bereichen der AAV-DNA aufweist. Dies können z. B. Mutationen im cap-Gen sein. Für einen solchen Fall ist es gefordert, daß ein exprimierbares AAV-cap-Gen in den erfindungsgemäßen Zellen vorliegt. Dies kann durch das die AAV-Replikation ermöglichende Mittel, z. B. dem AAV-Helfervirus, eingebracht sein. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, ein AAV-cap Gen, z. B. in ein AAV-Helfervirus zu inserieren.

Der Ausdruck "AAV-Helfervirus" umfaßt Viren, die eine Replikation von AAVs ermöglichen. Dies sind insbesondere Adenoviren, wie Adenovirus-2, und Herpesviren.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, rep-negative AAV-Mutanten bereitzustellen. Diese sind frei von Wildtyp-AAV, da Rekombinationsereignisse, wie sie bei transients Expression von Rep-Proteinen in Zel-

len eintreten, vermieden werden. Die vorliegende Erfindung stellt somit die Basis dar, die den Rep-Proteinen zugeschriebenen Aktivitäten auf einzelne Rep-Proteine bzw. Domänen davon zu beschränken. Damit ist die Möglichkeit gegeben, AAVs für therapeutische Zwecke zu verwenden. Diese finden sich insbesondere im Bereich der Gentherapie. Erfindungsgemäße rep-negative AAV-Mutanten können hierfür verwendbare Gene bzw. Genabschnitte tragen. Diese können insbesondere in dem rep-Gen und/oder cap-Gen liegen. Die vorliegende Erfindung stellt somit einen Durchbruch auf dem Gebiet der Herstellung von für Gentherapien verwendbaren Vektoren dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Rep-codierenden DNA im Expressionsplasmid pCMRep40. Das Start-ATG-Triplett und das Terminationscodon TGA sind angegeben, sie entsprechen denen des Wildtyp-AAV-Genoms. Durch gerichtete Mutagenese ist das Intron (Position: 1907–2227) entfernt, wodurch Rep 40 ohne Spleißen exprimiert werden kann.

Die Erfindung wird durch das Beispiel erläutert.

Beispiel

Bereitstellung einer AAV-Rep-Mutante

He10-1-Zellen werden mit der DNA der bekannten AAV-Rep-Mutante pTAV 2–3 transfiziert. pTAV2-3 weist eine "frameshift"-Mutation an der Position 1045 auf, wodurch alle vier Rep-Proteine inaktiviert sind (vgl. Heilbronn, R., et al, J. Virol. 64 (1990), 3012–3018). Die Zellen werden mit Adenovirus-2 (MOI = 10–20) infiziert. Danach werden sie mit 10^{-6} M Dexamethason induziert.

Nach ca. 30 h werden ein Teil der Zellen geerntet und die Gesamtzell-DNA isoliert. Diese wird mit den Restriktionsenzymen XbaI bzw. DpnI gespalten und in einem Southern-Blot analysiert. Hierzu wird 32 P-markierte AAV-DNA als Hybridisierungsprobe verwendet. Das Restriktionsenzym XbaI schneidet AAV-DNA nicht, ebenso spaltet das Restriktionsenzym DpnI keine in Eukaryoten replizierte DNA. Es wird replizierte pTAV2-3-DNA erhalten.

Desweiteren wird der Überstand der nicht geernteten Zellen abwechselnd eingefroren und aufgetaut sowie einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Der Überstand wird auf He10-1-Zellen titriert. Der Nachweis infektiöser AAVs wird durch Hybridisierung mit einer 32 P-markierten Sonde verfolgt, die für rep-negative AAVs spezifisch ist. Es werden infektiöse rep-negative AAV-Partikel nachgewiesen.

Vorstehende Daten zeigen, daß mit den erfindungsgemäßen Zellen rep-negative AAV-Mutanten bereitgestellt werden können.

Patentansprüche

1. Zellen, stabil exprimierend die AAV-Rep-Proteine 78 und 52 sowie 40 und/oder 68.
2. Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die AAV-Rep-Proteine Rep 78, 52 und 40 stabil exprimieren.
3. Zellen nach Anspruch 2, nämlich die Zelllinien He 10-1 (DSM ACC2193, He 22-2 (DSM ACC2192) und He 5-5 (DSM ACC2191).

4. Expressionsplasmid, nämlich pCMRep 40 (DSM 9491).

5. Verfahren zur Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- (a) Transfektion der Zellen nach einem der Ansprüche 1-3 mit der DNA einer rep-negativen AAV-Mutante,
- (b) Behandlungen der transfizierten Zellen von (a) mit einem eine AAV-Replikation ermöglichenden Mittel, insbesondere einem AAV-Helfervirus, und
- (c) Isolierung der in (b) erhaltenen rep-negativen AAV-Mutanten.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA der repnegativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) ein oder mehrere Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen im rep Gen aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) das rep Gen deletiert ist.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) das rep Gen zumindest teilweise durch ein Fremd-Gen ersetzt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5–8, dadurch gekennzeichnet, daß das AAV-Helfervirus ein Adenovirus oder Herpesvirus ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5–9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) eine weitere Mutation im cap-Gen aufweist, mit der Maßgabe, daß das die AAV-Replikation ermöglichende Mittel, insbesondere der AAV-Helfervirus, ein exprimierbares cap-Gen enthält.

11. rep-negative AAV-Mutante, erhalten durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 5–10.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

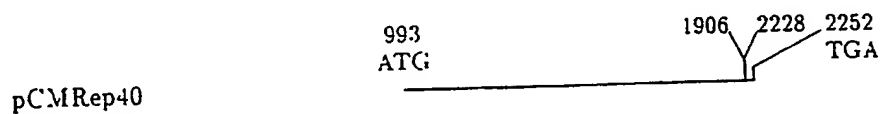


FIG. 1 Schematische Darstellung der Rep-codierenden DNA
im Expressionsplasmid pCMRep40